

专题情报资料05(总32)

天 然 气 蛋 白

(六)

四川省科学技术情报研究所

一九八〇年

中国气象出版社 (CHINA METEOROLOGICAL PRESS)

天 地 气 象 学

(六)

中国气象出版社 (CHINA METEOROLOGICAL PRESS)

1999. 12. 1000. 1

1000. 1

目 录

从甲醇生产单细胞蛋白——Norprotein法.....	1
微生物菌体的制造方法.....	7
革兰氏阳性甲醇同化菌的分离和鉴定.....	11
好气性微生物的培养方法及其装置.....	21
一种具有高的氧传递能力的新型发酵器.....	26
从微生物菌体中抽出有效成分的方法.....	30
从培养液中分离菌体的方法.....	34

从甲醇生产单细胞蛋白

——Norprotein法

Norprotein 公司已研制出一种从甲醇生产单细胞蛋白的方法，并对该法作了技术和经济评价。已在连续运转的试验装置中对该法作了进一步研究。本文叙述了过程中的主要操作段：发酵、絮凝、悬浮和干燥等，概述了一个生产能力为100,000吨/年的商业化工厂，讨论了大规模生产的经济情况。

背 景

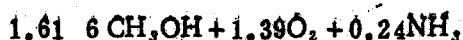
旨在探索利用甲醇作为单细胞蛋白生产的碳源和能源的筛选计划在六十年代末就已经开始进行了。在该计划范围内，分离出了几种使人感兴趣的甲醇利用菌。Norprotein公司自1974年以来，就已将其中一些菌用来研究一种可应用于商业规模生产动物饲料的单细胞蛋白生产过程。该过程已在一具有多种目的的试验装置中运转，其发酵容积为150升和4500升。示于图1中的几个主要操作段全都在连续运转中。

生 物

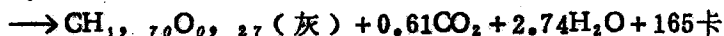
因为细菌能比酵母或霉菌更有效地利用甲醇，同时产率又高，所以选择了用细菌来生产单细胞蛋白。所选出的细菌—Methylomonas是只能在不含C—C键的碳化物上生长的专性甲基氧化菌，碳经由单磷酸核酮糖循环结合成甲醛，产生的果胶酶—6—磷酸盐的分解经Entner—Doudoroff途径完成。获得的细胞对甲醇的产率超过0.5克细胞/克甲醇。这种细菌不仅在连续培养中具有0.52/小时的最大比生长速度，而且在细胞密度远远超过50克/升的情况下也能良好地生长。这些值同用于单细胞蛋白生产中的其它菌株所获得的结果相似。这样的生长速度和可能的细胞密度使潜在的细胞产率超过25克细胞/升、小时。然而，要想获得这样高的产率，需得使氧传递速度超过40克O₂/升、小时（产率为0.5克细胞/克甲醇时的氧传递速度），这对于大规模生产装置来说将是难于实现的。

发 酵

在发酵过程中，甲醇、氧、氨和营养盐类将被转化成细胞物质、二氧化碳、水和热，形成的付产物如溶解的有机化合物，在最佳生长条件下是微不足道的，因而将它忽略。Norprotein法的化学计算可由下列关系表达：



+ 营养盐 →



不含复合营养素的新鲜培养基只以无机盐和甲醇为基础，多达80%的废培养基可返回发酵罐再用，并且对过程无任何负作用。进入发酵罐的物流有营养盐溶液、循环培养基、氨、甲醇和空气。含水进料需经加热灭菌，同时，还需采用特殊的预防措施以防止铁和铜在所升高的温度下沉淀。甲醇、氨和空气经过滤灭菌。

假若培养物被其它细菌所污染，则细胞对甲醇的产率往往会急剧下降，而且发酵过程也会变得难于控制。因此，本过程必须要在严格灭菌的条件下进行，这就使得有必要对进入发酵罐的一切物流进行灭菌处理，并且要特别留心发酵工程，以避免一切可能的污染源。从营养学和毒物学观点来看，制造一种组成不变的单细胞蛋白产品也是重要的。为了获得这样的产品，需使发酵过程在很确定和稳定的条件下进行，这是为什么单细胞蛋白发酵必须在灭菌条件下进行的另一个原因。

O_2 和 CO_2 的传递以及甲醇在培养基中的分布等因素对于要获得高的生产力和最大的细胞产率来说是极为重要的。因此，溶解氧的压力（tension）应高于空气饱和值的8—10%， CO_2 分压应低于0.3巴。此外，*Methylomonas methanolica*对高的甲醇浓度和甲醇浓度的改变极敏感。

实验室研究表明，当有规律的供给甲醇来培养*Methylomonas methanolica*菌株时，细胞产率随加入甲醇之时间间隔的增加而降低。这些结果与培养*Pseudomonas methylotrophica*所得到的结果是一致的。但是，当培养液中甲醇浓度低和稀释速度高时，有规律地供给甲醇所产生的负作用就没有上述那样明显。

人们对这一现象提出了不同的解释。因为在每加一次基质后，发酵罐中的甲醇浓度便暂时增加，而当培养物处于甲醇过量的环境中时，它的代谢作用随着少量甲醇进入细胞体而减弱并转而代谢出 CO_2 和水。此外，这种细菌对甲醇有很高的亲合力，饱和度为每升几毫克。即使慢慢地提高甲醇浓度也会引起甲醇和氧二者的同化作用明显增加。细胞密度较高时，可能出现暂时的氧耗尽，从而导致细胞产率降低。有规律性的供给甲醇可引起生长速度的波动，这也可能对细胞产率产生负作用。稀释速度较高时，生长速度接近 $\mu_{\max}$ ，只可能出现很小的波动，而在稀释速度较低时，由于对甲醇的亲合力强导致波动增大。

将甲醇连续供给一个能充分混合的实验室发酵罐时，甲醇浓度升高，获得最高细胞产率所需要的稀释速度也随之增大。甲醇进料浓度在20、30和40（克/升）时的最宜稀释速度分别为0.2、0.3和0.4以上（1/小时）。在试验装置中，只由一个点供给甲醇时，稀释速度较低的细胞产率为0.3—0.4克细胞/克甲醇。而改善甲醇在发酵器中的分布情况后，细胞产率获得明显的增加。这些结果同脉动试验中获得的结果相类似，并说明，对于非理想混合而言，即使很小的甲醇梯度也会对发酵过程产生重要的作用。

有助于获得高的细胞产率的几个因素是：甲醇均匀分散于肉汤中、甲醇进料浓度低以及稀释速度接近 $D_{\max}$ 。使稀释速度接近 $D_{\max}$ 可通过在最宜生长条件下在一高的稀释速度发酵或改变生长条件、PH或温度以降低 $D_{\max}$ 这两种途径进行。因此，设计本过程的细胞密度不应超过20—25克/升，且应使甲醇从几个段进入发酵罐，或者也可将甲醇汽化后同压缩空

气一起进入发酵罐。

絮 凝

从发酵罐取出的肉汤，其细胞浓度为25克/升。将这样一种稀的细胞悬浮液直接进行干燥，从经济观点来看，是不可能实现的。因此，在将它干燥之前，还必须先将细胞浓缩。

从发酵罐中取出的细胞悬浮液中的细胞无凝聚倾向。因细菌个体很小且细胞与生长基质之间的密度之差也甚小，故大规模生产中采用离心分离方法直接分离未经处理的细胞悬浮液是不经济的，为此，研究了将细胞凝成团的絮凝作用。因为细胞凝团可再经沉淀或悬浮从生长基中分离出来，故在此研究的基础上发展了一种絮凝方法。

絮凝方法需满足下述要求：

1. 使用的絮凝剂必须无毒。
2. 不允许降低细胞的营养价值。
3. 再循环的培养基必须不含抑制细胞生长的组份。
4. 蛋白质的回收率高。
5. 成本低。

现已对PH、温度、加入盐的变化和可采用的絮凝剂等诸因素对细胞凝团的影响进行了研究。研究结果表明，细胞先从培养基中分离出来，再悬浮于新鲜介质或水中，将比把它保留在生长介质中更容易被絮凝。因此，细胞絮凝的可能性取决于细胞和介质两者的性质。

发酵罐肉汤先经加热，然后加入酸降低其PH值，可使细胞得到有效絮凝。在加热期间，可溶的萃取细胞蛋白质的浓度增加，这大概起因于一些细胞壁的破裂。在加热期间可溶解的蛋白质，在PH值低时，将和细胞一块共沉淀。得到的细胞絮凝物通过悬浮作用来回收。悬浮作用由絮凝期间从肉汤中释放的CO₂引起。悬浮过程中可回收细胞浓度约为20%（干重）。现已对细胞浓度为25—30%的絮凝液作了过滤脱水试验。

悬浮过程中，干物质和蛋白质的回收率为95—100%，损失量取决于细胞中低分子组份的泄漏。因为非蛋白质组份的泄漏，故纯蛋白质含量较之未经絮凝的细胞高。已注意到絮凝期间，细胞菌体的营养价值没有被降低。悬浮期间排出的废介质可循环到发酵段再利用。

干 燥

在本法的开发期间，试验装置中干燥细胞是采用带有旋转喷射器的喷射干燥器进行。这种干燥法所获得的产品呈细粉状，故不适合大规模生产。由于饲料消费量降低而产生了细粉会降低蛋白产品饲用价值的说法。另外，从现在的卫生学观点来说，应避免加工粉状的蛋白产品。大规模生产中，必须将干燥过程设计成能生产具有适宜粒度产品的过程。现已研究出一种由带多个喷嘴的喷射干燥器组成的干燥方法，并同A/S Niro Atomizer公司共同作了试验。采用这种方法可生产粒度 $>200\mu$ 的粒子。

产 品

产品组成示于表1，并同大豆饼作了比较。该产品蛋白含量高（粗蛋白81%、纯蛋白67%），必需氨基酸的比例适当。

任何单细胞蛋白在出售和作饲料之前，必须通过广泛的毒物学和营养学试验。毒物学检查应表明用大剂量的这种产品饲养试验动物时无负作用，而营养学试验应表明，该产品在最佳条件下喂养目标类动物（即打算用以喂养的那些动物）的效果。

用Norprotein产品饲养鼠和日本鹌的短期毒性筛选试验已完成。此外，还对鼠、烧烤用鸡及貂类作了营养试验。这些试验表明Norprotein法的产品适于作家禽、猪、和毛皮动物的饲料组份。

商 业 規 模 生 产

图2示出了生产能力为100,000公吨/年装置的Norprotein过程。该装置有一个设计在严格灭菌条件下操作的发酵罐。此发酵罐操作压力为4巴。从发酵罐中排出的气体的能量在与压缩机相联结的涡轮中得以回收。排出的气体与热新鲜空气混合用于产品的干燥。收获段设计要求能满足食品工业中的卫生标准。为使其能不停产的状态下清扫设备，收获段由三组平行管线组成，当两组操作时，另一组停转清扫。从悬浮段排出的废介质返回发酵罐，少量排出的液体进行通常的废水处理。细胞悬浮物在两个平行的干燥器中干燥。从干燥器中排出的含有一些细胞的空气在一多段汾丘里洗涤系统中被净化，得到的产品经冷却后贮存起来。产品的大部份是以粉末状供给混合饲料工业。

年产100,000吨装置的经济性

表2 Norprotein的投资花费（100,000吨/年的甲醇单细胞蛋白装置）

	占总投资百分率 (1978年价格)
原材料	10
培养基的制备和利用	17
发酵	41
细胞回收和干燥	22
成品段	10
	100%

已对年产能力为100,000吨的装置作了成本估算。假定该装置建在Scandinavia，且不包括现有甲醇装置。这套装置的范围示于图2，假定是该装置的平面布局。投资费示于表2。经絮凝/悬浮段后，细胞糊的干细胞含量高，不另需分离器分离，故用于回收和干燥的投资比早先发表过的资料还低。

操作费的分布如表3所示。甲醇价格和细胞对甲醇的产率是影响全过程经济性的重要因素这点是很清楚的。甲醇今后的价格将是很难断定的，但普遍相信它将顺

着普通能源的价格发展。因此，将发酵器的规模扩大，即从实验室容积放大到生产容积时必

须是不降低细胞对甲醇的产率。

表 1 Norprotein 法SCP产品同大豆饼组成的比较

成 分	Norprotein 克/100g产品	大豆饼 克/100产品
干物质	95	88
粗蛋白 (N×6.25)	81	45
纯蛋白	67	42
灰	7.5	5.9
赖氨酸	4.8	3.2
蛋氨酸	1.7	0.6
胱氨酸	0.5	0.8
苏氨酸	3.6	1.9
白氨酸	5.9	3.5
异白氨酸	3.7	2.1
缬氨酸	4.7	2.2
酪氨酸	2.4	0.6
苯基丙氨酸	2.9	2.3
组氨酸	1.3	1.2
精氨酸	4.2	3.5

Norprotein / SCP 法

微生物菌体的制造方法

专 利 申 请 范 围

本专利是制造微生物菌体的方法。其特点是在以甲醇作为主要碳源的培养基中培养能资化甲醇的微生物，从甲醇浓度为0.02%（重量）以下的培养液中分离菌体，从而得到菌体以及甲醛含量极少乃至实质上不含甲醛的培养滤液。

发 明 的 详 细 说 明

本发明是关于制造一种能资化甲醇的微生物菌体的方法。更详细地说，它是获得甲醛含量极少乃至实质上不含甲醛的培养滤液和获得实质上不含甲醛的菌体产品的方法。

甲醇是有机化学工业产品中既价廉而又能大规模生产的产品之一。近年来，人们一直在研究试图使用以甲醇为主要碳源的培养基来培养能资化甲醇的微生物，以谋求获得微生物菌体。

而本发明人发现了，在使用了甲醇作为主要碳源的培养基来培养能够资化甲醇的微生物时，不管培养液中的甲醇浓度如何，只要经过充分水洗，菌体制品中就没有检查出甲醛；另外，在培养液的甲醇定为0.02%（重量）以下时，不管培养液的初期甲醇浓度如何，培养滤液中的甲醛含量都极少。根据上述发现，完成了本发明。

不过，为从含有甲醇的培养液中得到实际上不含甲醛的菌体制品，必须反复进行离心分离→水洗→离心分离→水洗那样的复杂处理，同时还必须耗费大量的水。因此，这种方法用于工业上制取微生物菌体，不仅手续烦杂，而且还会使费用增加，几乎不能在工业上实现。另一方面，从不含有甲醛的培养液中制取实际上不含甲醛的菌体产品的场合，能够省去水洗过程只需通过离心分离等分离办法就行。

甲醛含量较高的菌体制品用作食品是当然不宜，即使作为饲料也是不适宜的。再者，从培养液中分离出菌体后的滤液，其甲醛含量较大者，必须把甲醛除掉或无毒化，否则回到培养罐供给循环使用是不适宜的，就是作为工业废水予以排放，这也存在着公害的问题。而去掉甲醛或使之无毒化必须增加费用，因而此事对于工业生产是不利的。

本发明的目的是提供一种能资化甲醇的微生物菌体制造方法，它能获得甲醛含量极少或实质上不含甲醛的培养滤液，这种滤液不需经过特殊处理就能直接供作循环使用或者排放出去亦无妨。而且本菌体制造法能获得实质上不含甲醛的菌体制品。

本发明的微生物制造方法的特点是：用甲醇为主要碳源的培养基培养能资化甲醇的微生物，从甲醇浓度低于0.02%（重量）的培养液中分离菌体，获得菌体及甲醛的含量极少或实质上不含甲醛的培养滤液。

本发明中能资化甲醇的微生物有酵母、细菌等。其能资化甲醇的酵母有：属于Candida类的酵母、属于Sacchromyces类的酵母、属于Toulopsis类的酵母、属于Pichia类的酵母、属于Kloeckera类的酵母、属于Hansuenula类的酵母等。再者，其能资化甲醇的细菌有属于Pseudomonas类的细菌。

本发明中，分离微生物菌体时，培养液中的甲醇浓度必须低于0.02%（重量），最好低于0.01%（重量）。若此时的甲醇浓度超过0.02%，培养滤液中的甲醛含量就会变得较大，而在甲醇浓度低于0.01%时，培养液中就实质上不含甲醛，是最宜状态。

为使分离菌体时的培养液中的甲醇浓度低于0.02%（重量），乃至最好是使它低于0.01%（重量），采用下述的方法实施。

在培养初期，使培养液的甲醇浓度高于0.02%（重量）或者高于0.01%（重量），甲醇浓度随着培养过程的进行而降低，当降到0.02%（重量）以下，最好是在降到0.01%（重量）以下时，就可以从培养液中分离菌体，这是一种方法。另外，也可以从培养初期开始，便一直将培养液的甲醇浓度保持在0.02%（重量）以下，最好是保持在不到0.01%（重量）的特定浓度下进行培养。从这样培养所获得的培养液中分离微生物菌体，这样的办法也行。在此培养期间，还可根据需要补充甲醇以及/或者补充甲醇以外的其他培养基成分。

本发明不论采用分批培养还是连续培养办法都可以。分批培养通常用单罐实施；连续培养是用单罐或串联连接的几个罐子或用例如内装有多块多孔板的塔盘塔式培养罐实施。

关于培养基成分、量、培养温度及培养液的PH等，可根据所用微生物的种类适当地予以选择。

关于培养基成分，除主要碳源亦即甲醇外，通常还可使用例如铵盐、硝酸盐等无机氮化物或尿素、 α -コニステイフ・リカー、酪朊、酵母萃、肉萃等含有机氮化物等作氮源，并加入钙盐、镁盐、钾盐、磷酸盐、锰盐、锌盐、铜盐等无机盐类。根据需要还可再添加如维生素类、胺基酸类等生长所必需之物或促进生长之物质。

培养温度，培养液的PH通常分别在20—45℃范围内，2—10的范围内适当选择。

采用本发明，可以获得能循环再用的万用培养液和不会产生公害的培养废液，以及适于食用和用作饲料的菌体产品。

通过下述实例对本发明作更具体的说明。再者，下述实例中甲醇是用带有氢焰电离检测器的气体色谱仪分析的，甲醛是用乙酰丙酮法分析的。

另外，培养液的菌体浓度是指100克培养液中所含的干菌体重量（g），用“重量%”来表示。

实 例 1

由 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2克、 KH_2PO_4 2克、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5克、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2毫克、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5毫克、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2毫克、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5毫克、 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2毫克、生物素4微克、盐酸硫胺素200微克及甲醇10克溶解于1升水制得的培养基5升，加入容积为10升（有效容积为5升）的发酵罐中，用Saccharomyces methanofoms T—80菌株（微工研菌寄第1927号）接种，培养温度为30℃，一面用氨水把培养PH控制在4.7，一面通

气搅拌进行连续培养。

在平均停留时间定为 8 小时时,在发酵罐出口处的培养液中甲醇浓度为 0.05% (重量),菌体浓度为 0.38% (重量),分离菌体后的培养滤液中有 1 ppm 的甲醛。在平均停留时间定为 12 小时时,发酵罐出口处的培养液中的甲醇浓度成为 0.009% (重量),菌体浓度成为 0.37% (重量),从分离菌体后的培养滤液中完全未查见甲醛。

实 例 2

用 $\text{NH}_4\text{H SO}_4$ 2 克、 KH_2PO_4 4 克、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 克、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 克、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 毫克、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 毫克、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 毫克、 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 毫克、生物素 8 微克、盐酸硫胺素 400 微克及甲醇 20 克溶解于 1 升水中制成培养基,在 30°C , 培养 PH 为 4.5 的条件下,一面通气搅拌,一面用串联连结的两个培养 *Torulopsis methanofloat A-86* (微工研菌寄 1974 号) 的培养罐进行连续培养。

第一个发酵罐的总容积为 10 升,有效容积为 5 升。第二个罐的总容积为 5 升,有效容积为 2.5 升。在这两个罐中分别装入 5 升和 2.5 升上述培养基,随后在第一罐中接种上述微生物并开始培养。同时将上述培养基以 625 克/小时的速度供给第一个罐,再将第一罐的培养液以同一速度供给第二个罐。从开始供给培养基起经 50 小时后,在第二罐出口处的培养液中甲醇浓度为 0.008%,菌体浓度为 0.75%,从分离菌体的滤液中完全未查见甲醛。

实 例 3

使用的培养基是由 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 克、 KH_2PO_4 8 克、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 克、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 克、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 毫克、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 毫克、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 毫克、 $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.8 毫克、生物素 16 微克、盐酸硫胺素 800 毫克、甲醇 40 克溶解于 1 升水中而制成。在 30°C , 培养 PH 为 4.5 的条件下,串联三个具有二段多孔板的塔式培养罐连续通气培养 *Candia alcomigas Ya-23* 菌株。

一、二、三罐的有效容积分别为 1 升、0.5 升、0.25 升。将上述培养基以一定速度供给罐一,以使第一罐培养液的平均停留时间为 7 小时。培养液由第三罐出口排出。

从各罐出口处取出的培养液的甲醇浓度、菌体浓度及分离出菌体后的培养滤液的甲醛含量示于表 1。

表 1			
	第一罐	第二罐	第三罐
甲醇浓度 (重量%)	0.2	0.03	0.006
菌体浓度 (重量%)	1.44	1.50	1.50
甲醛含量 (Ppm)	2	0.5	未查出

实 例 4

用由 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 克、 KH_2PO_4 2 克、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 毫克、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 毫克、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 毫克、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 毫克、 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 毫克、生物

素4微克、盐酸硫胺素200微克及甲醇10克溶于1升水配制成的培养基5升，装入容积为10升（有效容积为5升）的发酵罐中，接种*Torulopsis methanophiles* nov.SP T-106（微工研菌寄第1928号）菌株。在34℃，一面用铵水把溶液PH控制在4.5，一面通气搅拌进行分批培养。从培养开始起经60小时后，菌体浓度为0.3%（重量），分离菌体后培养滤液中存在1 ppm的甲醛。培养65小时后，菌体浓度仍为0.3%（重量），从分离菌体后的培养滤液中并没有检查到甲醛。

参 考 事 例

培养基是由 NH_4HSO_4 3克、 KH_2PO_4 4克、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8克、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4毫克、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5毫克、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1毫克、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1毫克、 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1毫克和甲醇20克溶解于1升水配制成，培养PH为6.5。将这样制得的培养基5升装入容积为10升的发酵罐（有效容积为5升）中，接种甲醇氧化菌（微工研菌寄第1949号），培养温度为30℃，一面用氨水将PH控制在6.5一面通气搅拌进行连续培养。

在平均停留时间定为2.5小时的场合，培养罐出口处的培养液中的甲醇浓度为0.1%（重量）、菌体浓度为0.92%（重量），分离出菌体后的培养滤液中有1.5ppm的甲醛。在平均停留时间定为4小时的场合，培养罐出口处的培养液中甲醇浓度为0.007%（重量）、菌体浓度为0.91%（重量），分离出菌体后的培养液中完全未查见甲醛。

实 例 5

在实施事例1至4以及参考例中，将甲醇浓度高于0.02%（重量）和甲醇浓度低于0.02%（重量）的培养液分别地进行离心分离，并将其未经水洗的菌体原状冻结干燥后制成菌体产品，就其甲醛含量进行了分析，其结果如表2所示。

表 2

	(单位PPm)	
	从甲醇浓度高于0.02%的培养液中制成的菌体产品	从甲醇浓度低于0.02%的培养液所得的菌体产品
实例1	2	未检查到
实例2	—	"
实例3	4 * 1 *	"
实例4	2	"
参考例	3	"

*上面是从第一罐出口处取出

*下面是从第二罐出口处取出

（赵仲明译自日本专利昭和53—2950 校对：顾宝衡）

革兰氏阳性甲醇同化菌的分离和鉴定

提要——利用优裕培养技术从土壤试样中分离出了一种兼性的Methylotrophia革兰氏阳性细菌。根据它的分类学特点，将其鉴定为一种新的甲醇同化菌并命名为“*Cornebacterium methanophilum* sp. nov.”。该细菌能够利用甲醇、乙醇、正一丙醇、甘油、醋酸盐、正一丙酸盐、正一丁酸盐、苹果酸盐、葡萄糖、果糖、半乳糖、肌醇、山梨糖、甘露糖醇和麦芽糖等作为唯一碳源。

该细菌在甲醇浓度低于2%（体积/体积）时也能良好生长。当用一种由溶解氧浓度控制的自动进料装置将甲醇间歇进料和在温度为32℃、PH为7.0时得到了最大比生长率：0.24 1/小时。经过34小时的培养后，得到了21.2克/升的生物量。从440克甲醇和383.6克氧中生产了208.6克生物量。在实际操作中对甲醇的产率是47.4%，在阻止了培养过程中甲醇的蒸发以后，产率达到52%。对氧的产率是0.54（克细胞/克氧）。也报告了连续培养的结果。

该细胞含有68.4%的粗蛋白，10.9%的可提取的类脂物，0.6%的粗纤维，11.7%的糖类和6.8%的粗灰分。该生物物质的胃蛋白酶消化率为83.3%。总氨基酸含量为56.5%，相当于82.6%的粗蛋白。也描述了必需氨基酸的概况。

有几种细菌能将甲醇作为唯一碳源同化。但它们中的大多数都是革兰氏阴性菌，其种类属于Pseudomonas, Methanomonas, Methylomonas, Methylococcus, Achromobacter, Microcyclus, Vibrio, Protoaminobacter, 和Hyphomicrobium。已经培养了几种革兰氏阴性的细菌用于实际生产作为家畜家禽饲料的单细胞蛋白。以前也曾报导过几种革兰氏阳性的甲醇同化菌，如Arthrobacter, Bacillus和Corynebacterium。然而关于革兰氏阳性甲醇同化菌的鉴定和生长条件的报道一直很少。

在研究利用甲醇的微生物时，分离出了一种革兰氏阳性细菌，它将甲醇作为唯一碳源而在上面迅速生长。本文论述能同化甲醇的这种革兰氏阳性细菌的分离、鉴定、最佳培养条件以及它的细胞组成。该项工作的目的在于研究作为单细胞蛋白唯一碳源的甲醇被革兰氏阳性细菌利用的情况。

材 料 和 方 法

细菌的分离——利用表I的筛选培养基通过优裕培养从大约200个土壤、水和污泥试样中分离出了甲醇同化菌。当筛选培养基里的培养物生长良好时，将生长迅速的培养物选出并通过制成洋菜平面培养面纯化。表I描述的生长培养基里生长最迅速的细菌是从革兰氏阳性细菌中选出来的，整个研究过程都使用的这种细菌。

表 1

用于筛选和培养细菌的培养基组成

	筛 选 培 养 基				生 长 合 成	
	A	B	C		培养基	培养基
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.10%	0.10	—	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.30%	0.30
尿素	0.10	—	—	尿 素	0.10	0.10
NH_4NO_3	0.10	—	—	KH_2PO_4	0.20	—
NH_4Cl	—	—	0.10	K_2HPO_4	0.70	—
KH_2PO_4	0.10	0.10	0.05	KCl	—	0.05
Na_2HPO_4	—	0.10	—	H_3PO_4	—	0.36
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.02	0.02	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.05
酵母浸出液	0.001	0.001	—	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.003	0.003
微量元素*	1毫升/升	—	1毫升/升	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.004	0.004
维生素混合物**	—	1毫升/升	1毫升/升	NaCl	0.01	0.01
甲醇	1.6%	1.6	1.6	酵母浸出液	0.10	—
PH	7.0	7.0	7.0	甲 醇	1.6%	1.6
				(琼脂)	(2.0)	
				PH	7.0	7.0

* : 1升里面含有: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1000mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 100mg, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 500mg.

** : 1升里面含有: VB_1 10mg, VB_2 500mg, VB_6 100mg, 烟酸100mg, P-氨基苯甲酸100mg, 叶酸10mg, Ca-泛酸100mg, 生物素10mg, 胆碱2000mg, 肌醇100mg.

细菌的鉴定——按照美国细菌学家协会所推荐的常规方法测定了该细菌的一般特性。根据Bergey的“鉴定细菌学手册”第八版测定了该细菌的形态学、培养和生理学方面的性质。

培养条件——利用表 I 所述的生长培养基作为基础培养基对分离出的细菌进行培养以研究最佳生长条件。细菌是在一个含有50毫升培养基的500毫升振荡烧瓶中生长。在一个往复振荡器上(130转/分)和32℃时进行保温培养。

也使用了一个20升的发酵器。在用此发酵器进行培养时,通过甲醇的自动进料,将其浓度保持在不超过0.8克/升。供给培养容器的基质自动控制系统是以溶解氧浓度为信号而工作的。该系统 and Ohhashi 所描述过的在酵母生产时用于控制基质加入的系统一样包括一个溶解氧分析器,一个基质进料阀和进料泵。培养装置流程如图 1 所示。

利用同样的装置进行了连续培养,其平均存留时间为5.0小时。将含有除甲醇以外的各种组分的培养基连续加入发酵器,通过甲醇自动进料器将甲醇加入。其培养条件与间歇培养一样。

细胞浓度——通过用Hirama光度计在655nm处测量培养液体的光密度来对生长进行监控。用通常的方法直接测定了干细胞的重量。

甲醇——用带有火焰离子检测器的气体色层分离法对甲醇进行了分析。在 Shinjaltite

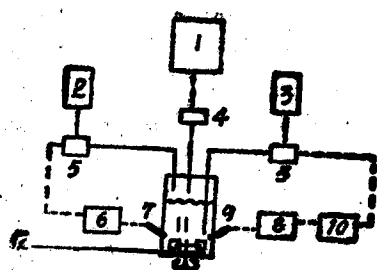


图 1：培养装置示意流程图。

(1) 进料培养基贮槽 (2) 水贮槽 (3) 甲醇贮槽
(4) 泵 (5) 阀 (6) PH计 (7) PH传感器 (8) 氧分析器
(9) 氧传感器 (10) 记录器 (11) 发酵器 (12) 空气

上的色谱柱由10%的聚癸二酸乙二醇酯组成，用它来对甲醇进行估算。用氮气作载体气。

粗蛋白——用 Kjeldahl 方法分析了细胞的总氮含量。

可提取的类脂物——将3克细胞悬浮在100毫升15%的盐酸溶液中。将该悬浮液煮沸7分钟。用滤纸将固体物质收集起来并用热水（50℃）将其洗至中性。在将此固体物质在 97 ± 2 ℃下脱水3小时后，用80毫升乙醚于 55 ± 2 ℃温度下在 Soxhlet 提取器中将其提取3小时。将乙醚蒸发后，就得到了类脂物。经脱水后，用通常的方法估算了类脂物的重量。

糖类——将2克细胞悬浮在20毫升10%的盐酸溶液中，并于 $98-99$ ℃下将其分解3小时，接着再用NaOH中和。用自动分析器对棕色的水解产物进行了分析以确定单糖含量。利用它们的铁氰化钾还原活性估算了单糖的量。

粗灰分——将2克细胞放在石英碟中，再将该碟放于温度为 $550-600$ ℃的电炉内灼烧2小时使细胞成为灰分。在冷至室温后，将灰分称重。

粗纤维——将2克细胞在200毫升1.25%的硫酸溶液中悬浮并煮沸30分钟。用滤纸将固性物收集起来，再用热水将其洗至中性为止。将洗过的固性物在 135 ± 1 ℃温度下脱水2小时。将干燥的固性物称重（I）。然后将其放入电炉内于 650 ℃下灼烧1.5小时使其成为灰分。将灰分称重（II）。细胞的粗纤维含量通过下式计算：

$$\text{粗纤维}(\%) = \frac{(\text{I}) \text{毫克} - (\text{II}) \text{毫克}}{\text{细胞试样重, 毫克}} \times 100$$

氨基酸组成——将1.5克细胞放在10毫升6N的盐酸溶液里于 110 ℃下水解24小时。在将水解产物的PH值调至2.5时，用“氨基酸自动分析器”对其进行测定。为了估算色氨酸和胱氨酸含量，将细胞用5N氢氧化钠溶液于 110 ℃下水解24小时。为估算蛋氨酸含量，将细胞用6N盐酸于 110 ℃下水解3小时。

胃蛋白酶消化率——按照A O A C (Association of official Agricultural Chemistry, OSA) 描述过的方法估算了细胞物质的胃蛋白酶消化率。

氧浓度——用“Toshiba—Beckman 777型”氧分析器测定了20升发酵器中溶解氧的浓度和从发酵器排出的废气中氧气的分压。在将发酵肉汁中的细胞用0.1%的 HgCl_2 溶液杀死后，分析了饱和的溶解氧浓度。

结 果 和 讨 论

革兰氏阳性甲醇同化菌的分离——从九州宫崎县的稻田、丘陵和森林中或河沟的污泥中取大约一克泥土，将其接种于含有50毫升筛选培养基（A、B和C）的500毫升振荡烧瓶中，在 32 ℃下供氧培育4至7天。将1毫升生长良好的培养物放在含有同样成分的新鲜培养基的

振荡烧瓶中进行重复培育。将所获得的优裕培养物用含有2%琼脂的生长培养基在洋菜平面上划线并于32℃下培育2天。分离出了五百株以上的革兰氏阳性和阴性的细菌菌株。



图2 *Corynebacterium metbano philum*
R—194的电子显微照片

获得革兰氏阳性细菌的机会更少，选出了5个能够在表I所描述的生长培养基中和32℃下迅速生长的革兰氏阳性细菌菌株。从它们中间又选出了最迅速生长的菌株R—194以供进一步研究。

菌株R—194的鉴定——表2和表3描述了菌株R—194在形态学，培养和生理等性质方面的特征。图2为菌株R—194的电子显微照片。菌株R—194是杆状和需氧的，不形成孢子和不运动。在其整个生长周期内，R—194的革兰氏染色均为阳性。它是不呈现多形态的，也

不呈现分枝的菌丝。肉汤斜面上的细胞在其生长周期内形状也不发生明显改变。在肉汤斜面上的早期生长阶段发现了快速分裂。

照按Bergey的“鉴定细胞学手册”第八版，“Procaryotae”被分为19个部分。其中第17部分“棍棒形类细菌”又被分成4个种属：*Corynebacterium*、

表2 R—194菌株的形态学和培养特征

细胞的形态学性质（肉汤琼脂平面，内含1.5% V/V的甲醇，32℃，24小时）	短杆状，0.7~0.9×1.6~2.7非多形态的，不分枝，革兰氏阳性，不运动，无鞭毛，无孢子形成和非抗酸性的。观察到了快速分裂。
培养性质	
①甲醇* 一肉汤琼脂菌落	缓慢生长，环状，表面起皱，凸的，波状，奶油色，有光泽、奶油状，不透明
②甲醇* 一合成琼脂菌落	良好生长，环状，表面平滑，凸的，全缘的，淡奶油色，有光泽，奶油状，不透明
③甲醇* 一肉汤琼脂斜面	中等生长，丝状的，暗色，不透明，奶油色
④甲醇* 合成琼脂斜面	良好生长，丝状的，暗，不透明，奶油色
⑤甲醇* 合成肉汁	环状或起皱的膜，淡奶油色，清澈，沉淀物
⑥肉汁	环状或起皱的膜，淡奶油色，清澈，沉淀物
⑦肉汁明胶穿刺	不液化上面生长最好

* 甲醇：1.5%（体积/体积）